

BEST AVAILABLE COPY

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年5月8日 (08.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/038074 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 5/06, A61K 35/28, A61P 25/00 (74) 代理人: .
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09510 (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2001年10月30日 (30.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社レノメディクス研究所 (RENOMEDIX INSTITUTE INC.) [JP/JP]; 〒061-0061 北海道札幌市中央区南1条西11丁目327番地20 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および (84) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本望 修 (HON-MOU, Osamu) [JP/JP]; 〒064-0801 北海道札幌市中央区南1条西24丁目1番 Hokkaido (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION OF MESOBLAST STEM CELLS OR ES CELLS INTO NERVE SYSTEM CELLS

(54) 発明の名称: 中胚葉幹細胞またはES細胞から神経系細胞への分化誘導方法

(57) Abstract: It is found out that when mesoblast stem cells or ES cells prepared from a mononuclear fraction separated from bone marrow fluid or cord blood are cultured in a fundamental liquid culture medium, the differentiation of these mesoblast stem cells or ES cells into nerve system cells or glial cells is induced. It is further found out that the induction of the differentiation of mesoblast stem cells or ES cells into nerve system cells is promoted by adding an ischemic brain extract to the above-described fundamental liquid culture medium. It is clarified that the nerve system cells obtained by the above method are capable of regenerating nerve in a cerebral infarction model, a dementia model, a spinal injury model and a demyelination model.

(57) 要約:

骨髄液または臍帯血から分離される単核細胞分画から調製した中胚葉幹細胞、またはES細胞を、基礎的培養液で培養すると、該中胚葉幹細胞または該ES細胞が神経幹細胞、神経細胞またはグリア細胞へ分化誘導することを見出した。さらに、上記の基礎的培養液に虚血脳抽出液を添加することにより、中胚葉幹細胞またはES細胞から神経系細胞への分化誘導が促進されることを見出した。また、上記分化誘導方法によって得られた神経系細胞は、脳梗塞モデル、痴呆モデル、脊髄損傷モデル、脱髄モデルにおいて、神経再生能力があることが判明した。

WO 03/038074 A1

WO 03/038074 A1



LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

中胚葉幹細胞または ES 細胞から神経系細胞への分化誘導方法

技術分野

本発明は、中胚葉幹細胞または ES 細胞から神経系細胞への分化誘導方法、およびその利用に関する。

背景技術

稀突起膠細胞（オリゴデンドログリア:oligodendrocyte）（Archer, DR. et al., Exp Neurol, 1994, 125, 268-77., Blakemore, WF. and Crang, AJ., Dev Neurosci, 1988, 10, 1-11., Gumpel, M. et al., Ann New York Acad Sci, 1987, 495, 71-85.）、またはシュワン細胞（Blakemore, WF., Nature, 1977, 266, 68-9., Blakemore, WF. and Crang, AJ., Dev Neurosci, 1988, 10, 1-11., Honmou, O. et al., J Neurosci, 1996, 16, 3199-208.）もしくはオルファクトリーエンシーティング細胞（olfactory ensheathing cells）（Franklin, RJ. et al., Glia, 1996, 17, 217-24., Imaizumi, T. et al., J Neurosci, 1998, 18(16), 6176-6185., Kato, T. et al., Glia, 2000, 30, 209-218.）等の髄鞘形成細胞を移植すると、動物モデルにおいて再有髄化が誘発され、電気生理学機能を回復させることができる（Utzschneider, DA. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91, 53-7., Honmou, O. et al., J Neurosci, 1996, 16, 3199-208.）。このような細胞を患者もしくは他人から調製して、細胞治療法に用いることも不可能ではないが、組織材料を脳または神経から採取しなければならないため問題が多い。

脳から得られる神経前駆細胞または幹細胞には、自己複製能力があり、

さまざまな細胞系譜の神経細胞や膠細胞に分化することが知られている (Gage, FH. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92, 11879-83., Lois, C. and Alvarez-Buylla, A., Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90, 2074-7., Morshead, CM. et al., Neuron, 1994, 13, 1071-82., Reynolds, BA. and Weiss, S., Science, 1992, 255, 1707-10.)。胎児組織から採取したヒト神経幹細胞を新生仔マウスの脳に移植すると、神経細胞と星状細胞に分化したり (Chalmers-Redman, RM. et al., Neurosci, 1997, 76, 1121-8., Moyer, MP. et al., Transplant Proc, 1997, 29, 2040-1., Svendsen, CN. et al., Exp Neurol, 1997, 148, 135-46.)、また再有髄化させることもできる (Flax, JD. et al., Nat Biotechnol, 1998, 16, 1033-9.)。脱髄化した齧歯類の脊髄に成人脳由来の神経前駆細胞を移植すると、再有髄化が行なわれて、インパルスの伝導を回復したことが報告されている (Akiyama, Y. et al., Exp Neurol, 2001.)。

これらの研究は、上記細胞が、神経系疾患の修復術に利用できるかもしれないことを示唆しているため、大きな関心を引いている。(Akiyama, Y. et al., Exp Neurol, 2001., Chalmers-Redman, RM. et al., Neurosci, 1997, 76, 1121-8., Moyer, MP. et al., Transplant Proc, 1997, 29, 2040-1., Svendsen, CN. et al., Exp Neurol, 1997, 148, 135-46., Yandava, BD. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96, 7029-34.)。

すでに本発明者は、ヒト成人由来の神経細胞を、脳より抽出・培養し、セルライン化し、その機能を検討し、当該神経細胞には、自己複製機能と多分化機能が存在することを見出した。すなわち、脳より得た神経細胞の前駆細胞 (progenitor cell) を単一細胞展開 (single cell expansion) し、セルライン化したものを in vitro の系でクローン分析を行った

ところ、自己複製能(すなわち、増殖能)と、多分化能[すなわち、ニューロン(neuron)、膠星状細胞(アストログリア;astrocytes)、稀突起膠細胞(オリゴデンドログリア;oligodendrocytes)への分化]が認められたことから、この細胞には神経幹細胞の性質があることが確認された。

実際に、この細胞をラット虚血モデル、外傷モデルを用いて移植実験を行ったところ、極めて良好な生着率、遊走、分化を示した。また、当該細胞を脊髄脱髄モデルラットへ移植したところ、機能的な髄鞘が形成されることが分かった。すなわち、脊髄脱髄モデルラットにおいて、脱髄された神経軸索が再有髄化され、神経機能が回復するものであり、当該細胞の移植治療法の効果を、組織学的、電気生理学的、行動科学的に確認した。

上記の事実から判断すれば、自己の脳より少量の神経組織を採取して、神経幹細胞を抽出・培養し、得られた神経幹細胞を、自己の脊髄の損傷部位に移植することは、自家移植療法として、極めて応用性の高い治療法となるものと考えられる。

しかしながら、脳より神経幹細胞を含んだ組織を採取することは、採取にあたって神経脱落症状が発生しないとはいえ、容易なことではない。したがって、より安全で、かつ簡便な自家移植療法を確立することは、今日の複雑な各種疾患に対する治療法の確立という点から、極めて重要なことであった。これに対し、本発明者は、ドナー細胞の獲得のために、神経幹細胞の採取技術より容易である、骨髓細胞、臍帯血細胞、または胎児肝細胞より単核細胞分画等を採取する技術を開発した(特願2001-160579)。すなわち、本発明者は、骨髓細胞より調製した単核細胞分画が神経系細胞への分化能を有するものであることを見出した。さらに、本発明者は、該単核細胞分画から分離した中胚葉幹細胞を含む細胞分画、間質細胞を含む細胞分画、および AC133 陽性細胞を含む細胞分画

が神経系細胞への分化能を有することを見出した。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、中胚葉幹細胞または ES 細胞から神経系細胞への分化誘導方法、該方法により得られる神経系細胞、該神経系細胞を含む神経系疾患の治療ための組成物、および該組成物を用いた神経系疾患の治療方法を提供することにある。

本発明者は、骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画に含まれる中胚葉幹細胞、または ES 細胞が、in vitro において、神経系細胞への分化誘導することを新たに見出した。

具体的には、骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画から調製した中胚葉幹細胞または ES 細胞を、培養液 1 (DMEM (Dulbecco's modified essential medium) 50%、F-12 50%、FSC 1%、bFGF (Basal fibroblast growth factor) 10 ng/ml を連日添加、EGF (Epidermal growth factor) 10 ng/ml を連日添加)、または培養液 2 (NPBM (Neural Progenitor Basal Medium)、2% Neural survival factors (Clonetics)、0.2% hEGF (human Epidermal growth factor)、0.2% Gentamicine-amphotericin B、0.2% hFGF (human fibroblast growth factor)、bFGF 10 ng/ml を連日添加、EGF 10 ng/ml を連日添加)において、浮遊したままの状態で、5%CO₂、37℃で培養すると、該中胚葉幹細胞または該 ES 細胞が神経幹細胞へ分化誘導することを見出した。

また、骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画に含まれる中胚葉幹細胞、または ES 細胞を、培養液 1 (DMEM 50%、F-12 50%、FSC 1%) 若しくは培養液 2 (NPBM (Neural progenitor cell basal medium: Clonetics)、2% Neural survival factors (Clonetics)、0.2% hEGF (human

Epidermal growth factor)、0.2% Gentamicine-amphotericinB、0.2% hFGF(human fibroblast growth factor))において培養することにより、該中胚葉幹細胞または該 ES 細胞が神経細胞またはグリア細胞へ分化誘導することを見出した。

さらに、上記の培養液に虚血脳抽出液を添加することにより、中胚葉幹細胞または ES 細胞から神経系細胞への分化誘導が促進されることを見出した。

また、上記分化誘導方法によって得られた神経系細胞の神経再生能力に関しては、脳梗塞モデル、痴呆モデル、脊髄損傷モデル、脱髄モデルにおいて検討を行った結果、脳から抽出・培養した神経幹細胞と同じ程度の再生能力があることが判明した。

以上の結果から、脳梗塞、痴呆、脊髄損傷、脱髄疾患等の治療に、上記分化誘導方法によって得られる神経系細胞を使用することが可能となった。また、本発明はより一般的で、広領域の脳神経損傷に対する神経移植・再生療法への応用も可能であると考えられる。すなわち、中枢神経系および末梢神経系の虚血性脳神経損傷、外傷性脳神経損傷、脳神経変性疾患、代謝性神経疾患への自家移植療法に応用可能である。

さらに、上記分化誘導方法は、中胚葉幹細胞や ES 細胞から神経系細胞への分化の機序を解く糸口を提供している。このような分化を規定する遺伝子が同定・解析されれば、それら遺伝子を利用して中胚葉幹細胞や ES 細胞を効率良く、また十分量、神経系細胞へ形質転換させることが可能となる。従って、神経組織の再生を促すための「遺伝子治療」が可能となるものと大いに期待される。

すなわち、本発明は、中胚葉幹細胞または ES 細胞から神経系細胞への分化誘導方法、該方法により得られる神経系細胞、該神経系細胞を含む神経系疾患の治療ための組成物、該組成物を用いた神経系疾患の治療方

法に関し、より具体的には、

〔１〕 脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画に含まれる中胚葉幹細胞、または ES 細胞を、基礎的培養液において、33℃～38℃の条件で培養することにより、神経系細胞へ誘導する方法、

〔２〕 単核細胞分画が、脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血を、2000 回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重 1.07g/ml から 1.1g/ml の範囲に含まれる細胞分画を回収することにより調製することができる細胞分画である、〔１〕に記載の方法、

〔３〕 中胚葉幹細胞が SH2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD34(-), CD45(-)の特徴を有する細胞である〔１〕または〔２〕に記載の方法、

〔４〕 神経系細胞が神経幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞、およびグリア細胞からなる群より選択される、〔１〕～〔３〕に記載の方法、

〔５〕 基礎的培養液に bFGF、EGF、または虚血脳抽出液を加えることを特徴とする、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法、

〔６〕 〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法によって得られる細胞、

〔７〕 〔６〕に記載の細胞を含む、神経系疾患の治療ための組成物、

〔８〕 神経系疾患が、中枢性および末梢性の脱髄疾患、中枢性および末梢性の変性疾患、脳卒中、脳腫瘍、高次機能障害、精神疾患、てんかん、外傷性の神経系疾患、および脊髄梗塞からなる群より選択されるものである、〔７〕に記載の組成物、

〔９〕 〔６〕に記載の細胞、または〔７〕に記載の組成物をレシピエントに移植することを特徴とする、神経系疾患の治療方法、

〔１０〕 神経系疾患が、中枢性および末梢性の脱髄疾患、中枢性およ

び末梢性の変性疾患、脳卒中、脳腫瘍、高次機能障害、精神疾患、てんかん、外傷性の神経系疾患、および脊髄梗塞からなる群より選択されるものである、〔9〕に記載の治療方法、

〔11〕 移植する細胞がレシピエントに由来している、〔9〕または〔10〕に記載の治療方法、を提供するものである。

本発明においては、まず、脊髄動物から採取した骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画に含まれる中胚葉幹細胞、またはES細胞を、基礎的培養液において、33℃～38℃の条件で培養することにより、神経系細胞へ誘導する方法を提供する。

本発明において、脊髄動物としては、好ましくは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、うさぎ、ブタ、イヌ、サル、ヒトなど）を指すが、特に制限されない。

本発明において使用される骨髓液は、例えば、脊髄動物（ヒトを含む）を麻酔し（局所または全身麻酔）、骨に針を刺し、シリンジで吸引することにより採取することができる。該骨としては、例えば大腿骨、胸骨、骨盤を形成している腸骨等が挙げられるが、これらに限定されない。また、出生時に臍帯に直接針を刺し、注射器で吸引して、臍帯血を採取保存しておくことは確立された技術となっている。

本発明における単核細胞分画は、脊髄動物から採取した骨髓液または臍帯血を、2000回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07g/mlから1.1g/mlの範囲に含まれる細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味する。通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、好ましくは1.07g/mlから1.08g/mlの範囲（例えば、1.077g/ml）である。密度勾配遠心の

ための溶液としては、Ficol 液や Percol 液を用いることができるがこれらに制限されない。

具体例を示せば、まず、脊椎動物より採取した骨髓液 ($5-10\mu\text{l}$) を溶液 (IL-15 を 2ml、Ficol を 3ml) に混合し、遠心 (2000 回転で 15 分間) し、単核細胞分画 (約 1ml) を抽出する。この単核細胞分画を細胞の洗浄のために培養溶液 (NPBM 2ml) に混合して、再度、遠心 (2000 回転で 15 分間) する。次いで、上澄みを除去した後、沈降した細胞を回収する。

本発明における単核細胞分画は、培養液の状態としても、下記の中胚葉幹細胞の調製に使用できる。単核細胞分画を含む培養液としては、単核細胞分画を、例えば、培養液 1 (DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium-Low Glucose)、10% FBS (fetal bovine serum)、1% anti-biotic-antimycotic solution)、培養液 2 (MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium)、10% MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement)、4 mM L-Glutamine、1% Penicillin-Streptomycin) または培養液 3 (DMEM (sigma)、10% FBS (gibco)、1% Penicillin-Streptomycin、2mM L-Glutamine (gibco)) 中で、 37°C 、5% CO_2 in air の条件で培養することで調製できる。

本発明においては、上記単核細胞分画 (培養液の状態も含む) から中胚葉幹細胞を調製する。「中胚葉幹細胞」とは、発生学的に中胚葉と分類される組織を構成している細胞を指し、血液細胞も含まれる。また、中胚葉幹細胞とは、自己と同じ能力を持った細胞をコピー (分裂、増殖) することができ、中胚葉の組織を構成している全ての細胞へ分化し得る能力を持った細胞を指す。中胚葉幹細胞は、例えば、SH2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD34(-), CD45(-) の特徴を有する細胞であるが、これらマーカーに特に制限されない。

中胚葉幹細胞は、例えば、脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血

を、900gで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重 1.07g/ml から 1.1g/ml の範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することも可能である。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味し、通常 10～30 分間程度である。回収する細胞の比重は、細胞の由来する動物の種類（例えば、ヒト、ラット、マウス等）により変動しうる。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol 液や Percol 液を用いることができるがこれらに制限されない。

具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した骨髄液（25ml）または臍帯血を同量の PBS 溶液に混合し、遠心（900g で 10 分間）し、沈降細胞を PBS に混合して回収（細胞密度は 4×10^7 細胞/ml 程度）することにより、血液成分を除去する。その後、そのうち 5ml を Percol 液（1.073 g/ml）と混合し、遠心（900g で 30 分間）し、単核細胞分画を抽出する。細胞の洗浄のために、抽出した単核細胞分画を、例えば、培養溶液 1（DMEM, 10% FBS, 1% anti-biotic-antimycotic solution）、培養液 2 または培養液 3 に混合し、遠心（2000 回転で 15 分間）する。次いで、遠心後の上澄みを除去し、沈降した細胞を回収し、培養する（37℃、5% CO₂ in air）。

また、中胚葉幹細胞は、例えば、上記単核細胞分画の中から、上記 SH 2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD34(-), CD45(-)等の細胞表面マーカーを有する細胞を、抗体を使用して選択することにより取得することができる。選択方法としては、特に制限はなく、マグネットビーズを使用する方法、または、通常のセルソーター（FACS 等）を使用する方法等が例示できる。

また、本発明における ES 細胞の調製方法としては、当業者らに周知の

方法 (Doetschman TC, et al. J Embryol Exp Morphol, 1985, 87, 27-45, Williams RL et al., Nature, 1988, 336, 684-687) によって調製可能である。本発明においては、このようにして調製された ES 細胞を、実施例に記載の条件等において、神経系細胞へ分化誘導させることが可能である。

本発明においては、上記中胚葉幹細胞または上記 ES 細胞を、基礎的培養液において、33℃～38℃の条件で培養する。

本発明における基礎的培養液としては、細胞培養に使用される通常の培養液であれば特に制限はないが、好ましくは、DMEM (Dulbecco's modified essential medium) または NPBm (Neural progenitor cell basal medium: Clonetics) である。上記基礎的培養液のその他の成分としては、特に制限はないが、好ましい態様としては、実施例 2 に記載の培養液に含まれる F-12、FSC、Neural survival factors (Clonetics) 等が挙げられる。これらの培養液中の濃度としては、特に制限はないが、好ましくは、F-12 は 50%、FSC は 1% である。また、培養液における CO₂ 濃度は好ましくは 5% であるが、特に制限されない。

また、本発明の好ましい態様としては、上記中胚葉幹細胞または上記 ES 細胞についての基礎的培養液に、bFGF (Basic fibroblast growth factor) または EGF (Epidermal growth factor) を添加する。この場合、これらは単独で添加しても、両方添加してもよい。上記 bFGF または EGF の濃度としては、1ng/ml～100ng/ml が挙げられが、好ましくは、10ng/ml である。添加時期や添加方法としては、特に制限はないが、好ましくは、上記中胚葉幹細胞または上記 ES 細胞を該基礎的培養液で培養しながら、連日添加する方法が挙げられる。また、中胚葉幹細胞を神経幹細胞へ分化誘導を行う際には、上記基礎的培養液に bFGF および EGF を添加することが好ましい。

また、本発明における培養の温度条件としては、33℃～38℃であるが、好ましくは、37℃である。

その他の培養条件には、特に制限はない。細胞は、浮遊した状態（Neurosphere 状態）であっても、培養容器に付着した状態であってもよい。該培養容器としては、例えば、ノンコーティングディッシュ（non-coating dish）等が挙げられる。

本発明においては、上記基礎的培養液およびその他の成分を含む該基礎的培養液に、虚血脳抽出液を加えることで、上記中胚葉幹細胞、または上記 ES 細胞から上記神経系細胞への誘導を促進することが可能である。本発明においては、このような神経系細胞への誘導促進方法もまた提供する。

本発明における虚血脳抽出液としては、例えば、脊髄動物の虚血脳の粉碎液を遠心分離することで調製することが可能である。具体的には、全脳虚血モデル動物（ラット等）より全脳を摘出し、作製した小切片を NPBM（神経幹細胞用培養液）に加え、ホモジェナイザーにて機械的に粉碎する。次いで、800rpm で 5 分間遠心し、上澄みを集め、メンブレンフィルターにて細胞成分を除去することで虚血脳抽出液を調製することができるが、この方法に限定されない。該全脳虚血モデル動物としては、動物をネンブタールで麻酔後、生理食塩水にて灌流することで作製することが可能である。このようにして得られた虚血脳抽出液を、上記基礎的培養液およびその他の成分を含む該基礎的培養液に添加する。添加時期としては、特に制限はない。

本発明においては、上記の条件により、上記中胚葉幹細胞または上記 ES 細胞を培養することで、神経系細胞へ誘導する。該神経系細胞としては、具体的には、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞、またはグリア細胞等を例示することができる。

本発明は、上記方法によって得られる細胞を提供する。該細胞とは神経系細胞であり、例えば、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞、またはグリア細胞等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明は、また、上記方法によって得られる細胞を含む神経系疾患の治療のための組成物を提供する。本発明の細胞はそのまま移植に用いることも可能であるが、移植による治療効率を向上させるために、種々の薬剤を添加した、あるいは遺伝子導入した組成物として、移植することも考えられる。

本発明の組成物の調製においては、例えば、①本発明の細胞の増殖率を向上させる、または神経系細胞へのさらなる分化を促進する物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、②本発明の細胞の損傷神経組織内での生存率を向上させる物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、③本発明の細胞が、損傷神経組織から受ける悪影響を阻止する物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、④ドナー細胞の寿命を延長させる物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、⑤細胞周期を調節する物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、⑥免疫反応の抑制を目的とした物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、⑦エネルギー代謝を活発にする物質の添加、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、⑧ドナー細胞のホスト組織内での遊走能を向上させる物質、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入、⑨血流を向上させる物質、あるいはこのような効果を有する遺伝子の導入（血管新生誘導も含む）、を行うことが挙げられる、これらに制限されるものではない。

本発明の細胞および組成物は、レシピエントに移植することで、神経系疾患の治療に用いることができる。治療の対象となる神経系疾患とし

ては、例えば、中枢性および末梢性の脱髄疾患、中枢性および末梢性の変性疾患、脳卒中（脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血を含む）、脳腫瘍、痴呆を含む高次機能障害、精神疾患、てんかん、外傷性の神経系疾患（頭部外傷、脳挫傷、脊髄損傷を含む）、並びに脊髄梗塞が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明によれば、レシピエント由来の骨髓液または臍帯血から分離して得た細胞をドナー細胞として移植することができる（自家移植療法）。このことは、移植による拒絶反応の危険性も少なく、免疫抑制剤を併用しなければならない困難性がない点で好ましい。自家移植療法が困難な場合には、他人または他の動物由来の細胞を利用することも可能である。細胞は冷凍保存したものであってもよい。

患者への細胞の移植は、例えば、移植する細胞を、人工脳脊髄液や生理食塩水などを用いて浮遊させた状態で注射器に溜め、手術により損傷した神経組織を露出し、この損傷部位に注射針で直接注入することにより行うことができる。本発明の細胞は、遊走能が高いため、神経系組織内を移動することができる。従って、損傷部位の近傍へ移植してもよい。また、脳脊髄液中への注入でも効果が期待できる。この場合、通常の腰椎穿刺で細胞を注入することができるため、患者の手術の必要はなく、局所麻酔のみで済むため、病室で患者を処置できる点で好適である。さらに、動脈内や静脈内への注入でも効果が期待できる。従って、通常の輸血の要領での移植が可能となり、病棟での移植操作が可能である点で好適である。

また、本発明の細胞は、その遊走能の高さから、遺伝子の運び屋（ベクター）として利用することも考えられる。例えば、脳腫瘍などの各種神経疾患に対する遺伝子治療用ベクターとしての利用が期待される。

図面の簡単な説明

図1は、培養中胚葉幹細胞を示す写真である。中胚葉系細胞のマーカーである SH3 を発現してはいるが (A)、神経幹細胞のマーカーである nestin は陰性である (B)。培養条件下での分化誘導後、形態学的にも神経幹細胞様に変化し、また、中胚葉系細胞のマーカーである SH3 が陰性化し (C)、神経幹細胞のマーカーである nestin は陽性となる (D)。スケールバーは、A, B では $10\mu\text{m}$ を示し、C, D では $200\mu\text{m}$ を示す。

図2は、中胚葉幹細胞を培養条件下で神経幹細胞へ分化誘導し、さらに続けて分化誘導すると、神経細胞 (A, D)、アストロサイト (B, E)、オリゴデンドロサイト (C, F) へと分化することを示す写真である。D はNSE (neuron-specific enolase)、E はGFAP (glial fibrillary acidic protein)、F はGalC (galactocerebroside) で免疫染色した写真である。スケールバーは $25\mu\text{m}$ を示す。

図3は、移植細胞が脳梗塞巣を修復したことを示す写真である。中胚葉幹細胞を培養条件下で神経幹細胞へ分化誘導したドナー細胞はLacZ 遺伝子 (大腸菌 β ガラクトシデースを発現する) で遺伝的にマークしており、基質のX-gal で処理すると反応し青色を発色する。したがって、ドナー細胞を宿主脳組織内で追跡することが可能である。ラット脳梗塞モデル (中大脳動脈一時閉塞モデルで、大脳基底核、側頭葉、海馬等が脳梗塞に陥る) にLacZ 遺伝子でマークしたドナー細胞を移植した結果、脳梗塞に陥った大脳基底核、側頭葉、海馬等に生着し、組織修復を行った。

図4は、移植細胞が脊髄損傷部位を修復したことを示す写真である。ラット脊髄損傷モデル (第一胸髄レベルで横断したモデル) にLacZ 遺伝子でマークしたドナー細胞を移植した結果、ドナー細胞は損傷を受けた部位ばかりか、脳 (A)、頸髄 (B)、腰髄 (C) のへも遊走し、組織

修復を行った。D, E, FはA, B, Cを高倍率で観察した写真である。A, B, C, D, E, Fにおけるスケールバーは、A, B, Cでは200 μm を示し、D, E, Fでは10 μm を示す。

図5は、移植細胞が脊髄脱髄部位を修復したことを示す写真である。Aは、成人中胚葉幹細胞由来より誘導した神経幹細胞を成熟ラット脊髄脱髄領域へ移植後、再有髄化を示す写真である。Bは再有髄化軸索を高倍率で観察した写真である。A, B, C, D, E, Fにおけるスケールバーは、A, B, Cでは250 μm を示し、D, E, Fでは10 μm を示す。

図6は、ES細胞から誘導した神経幹細胞で、nestin陽性のニューロスフィア(neurosphere)の写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] 単核細胞分画および中胚葉幹細胞の調製

(1) 単核細胞分画および該単核細胞分画の培養液

マウス(およびヒト)から採取した細胞サンプルを、Ficoll 3mlを含むL-15培地(2ml)中に希釈して、遠心分離(2,000rpm、15分間)した。単核球分画から細胞を集め、2mlの無血清培地(前駆神経細胞維持培地(Neural Progenitor cell Maintenance Medium):NPMN)中に懸濁し、さらに遠心分離(2,000rpm、15分間)して、上澄みを除去し、沈降した細胞を回収した。この細胞を再びNPMNに懸濁し、単核細胞分画を調製した。

また、単核細胞分画を、培養液1(DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium-Low Glucose) 10% FBS (fetal bovine serum)、1% anti-biotic-antimycotic solution)、培養液2、培養液3中で、37℃、5% CO₂の条件で培養し、該単核細胞分画の培養液を調製した。

(2) 中胚葉幹細胞

上記(1)に記載の方法で調製した単核細胞分画、または該単核細胞分画の培養液から、SH2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD34(-), CD45(-)等の特徴を有する細胞を、抗体を使用して抽出した。選別方法は、マグネットビーズを使用する方法、または、通常のセルソーター(FACS等)を使用する方法を用いた。

[実施例2] 中胚葉幹細胞から神経系細胞への分化誘導

(1) 中胚葉幹細胞から神経幹細胞への誘導

まず、洗浄を行い、次いで、培養溶液から細胞を、酵素処理(試薬(0.05% trypsin, 0.02% EDTA)、室温、5分間)によってはがし、等量の培養液を加え、数回ピペッティングし、単一細胞までバラバラにした。次いで、600回転で5分間遠心した。沈殿した細胞をピペットで吸い上げた。次いで、新しい培養液1(DMEM(Dulbecco's modified essential medium) 50%、F-12 50%、FSC 1%、Basib fibroblast growth factor (bFGF) 10 ng/mlを連日添加、Epidermal growth factor (EGF) 10 ng/mlを連日添加)または培養液2(NPBM (Neural progenitor cell basal medium: Clonetics)、2% Neural survival factors (Clonetics)、0.2% hEGF(human Epidermal growth factor)、0.2% Gentamicine-amphotericin B、0.2% hPGF(human fibroblast growth factor)、Basib fibroblast growth factor (bFGF) 10 ng/mlを連日添加、Epidermal growth factor (EGF) 10 ng/mlを連日添加)、培養容器(on-treated polystyrene dish)において、浮遊したままの状態、5%CO₂、37℃で培養を継続した。

(2) 中胚葉幹細胞から神経細胞やグリア細胞への誘導

培養している中胚葉幹細胞の培養液を、新しい培養液(DMEM(Dulbecco's modified essential medium) 50%、F-12 50%、FSC 1%)若しくは培

養液 2 (NPBM (Neural progenitor cell basal medium: Clonetics)、2% Neural survival factors (Clonetics)、0.2% hEGF (human Epidermal growth factor)、0.2% Gentamicine-amphotericinB、0.2% hFGF) に変えて、約 4 週間程度培養する方法によって、中胚葉幹細胞から直接的に(神経幹細胞への転換をせずに)神経細胞やグリア細胞へ分化誘導させることにも成功した。

上記(1)および(2)の方法による中胚葉幹細胞から神経系細胞への分化誘導の確認は、中胚葉系細胞のマーカーである SH2 や SH3 が消え(神経幹細胞のマーカーである nestin はもともと陰性)、その代わり、神経幹細胞のマーカーである nestin が陽性となることで行った(図 1)。

中胚葉幹細胞から神経系細胞への分化誘導により、培養細胞は形態的にも変化した。具体的には、単一細胞だった細胞がニューロスフィア(neurosphere)を形成した(図 1)。また、この神経幹細胞から、神経細胞(NSE 陽性)やグリア細胞(GFAP 陽性)が分化してくることも確認した(図 2)。

〔実施例 3〕 虚血脳抽出液を用いた、中胚葉幹細胞から神経系細胞への分化誘導の促進

脳に虚血ストレスを負荷し、虚血脳の抽出液を、培養中胚葉幹細胞へ添加することで、中胚葉幹細胞が神経幹細胞へ高率で分化することを見出した。この方法によると、培養中胚葉幹細胞が神経幹細胞へ、わずか数日間で高率に誘導できることが分かった。

(1) 虚血脳抽出液の作製

まず、ラットをネンブタールで深麻酔後、前腹壁から前胸部を切開し、心臓および上行大動脈を露出する。心尖部を切開し左心室から上行大動脈にチューブを挿入する。次に右心耳に切開を入れ、チューブより生理

食塩水を3分間灌流させ、十分な全身の脱血を行った。灌流後、4～5時間そのまま放置し、全脳虚血モデルとした。次いで、上記の全脳虚血モデルラットより大脳、中脳を摘出し、尖刀にて1～2 mm程度の小切片にした。作製した小切片をNPMNに加え、ホモジェナイザーにて機械的に粉碎し、混濁液を作製した。次いで、混濁液を遠心管に移し、800 rpm、5分間遠心分離を行い、上澄みを集めた。0.22 μ mのメンブレンフィルターにて細胞成分を除去し、虚血脳抽出液とした。

(2) 培養中胚葉幹細胞 (MSC) の神経幹細胞への分化誘導

MSC細胞を100 mm non-coating dish (IWAKI)、conditioning medium (3種類：別記)、37℃ 5%CO₂の条件にて培養を継続した。90% confluentで、パスツールピペットで培養液を吸い取り、Dulbecco's PBSで3回リンスした。0.05% Trypsin、0.02% EDTA in PBSを2ml加え、細胞がはがれるまで37℃で2～5分間インキュベートした。conditioning mediumを2ml加え、Trypsinの反応をとめた。上清および剥がれた細胞をパスツールピペットにて、遠心管に集め、数回ピペティングした後、1000 rpm 5分間で遠心分離を行った。上清を捨て、NPMNを加え再懸濁した。37℃に温めておいた50%NPMN、50%虚血脳抽出液培地にまき、37℃、5% CO₂の条件下、100mm non-coating dish(IWAKI)で浮遊培養した。bFGF 10 ng/ml および EGF 10 ng/ml を連日添加した。

[実施例4] 神経再生能の評価

上記分化誘導方法によって得られた神経系細胞の神経再生能力に関しては、脳梗塞モデル(図3)、痴呆モデル(図3)、脊髄損傷モデル(図4)、脱髄モデル(図5)での検討の結果、脳から抽出・培養した神経幹細胞と同じ程度の再生能力があることが判明した。

[実施例 5] ES 細胞から神経系細胞への分化誘導

マウス ES 細胞を 100 mm gelatin-coating dish (IWAKI)、conditioning medium 20ml (DMEM、10%FCS、 $100\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、1000 UNITS/ml ESGRO (CHEMICON))、 37°C $5\%\text{CO}_2$ の条件にて培養を継続した。90% confluent で、パスツールピペットで培養液を吸い取り、PBS で 3 回リンスした。 0.25% Trypsin、 0.03% EDTA in PBS を 2ml 加え、細胞がはがれるまで 37°C で 2~5 分間インキュベートした。FCS を $400\mu\text{l}$ 加え、Trypsin の反応をとめた。上清および剥がれた細胞をパスツールピペットにて、遠心管に集め、数回ピペティングした後、1000 rpm 5 分間で遠心分離を行った。上清を捨て、NPM を加え再懸濁した。 37°C に温めておいた 50% NPM、50% 虚血脳抽出液培地にまき、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下、100 mm non-coating dish (IWAKI) で浮遊培養した。bFGF 10 ng/ml および EGF 10 ng/ml を連日添加した。

産業上の利用の可能性

本発明は、脳梗塞、痴呆、脊髄損傷、脱髄疾患等の治療に大きく貢献するものである。また、本発明はより一般的で、広領域の脳神経損傷に対する神経移植・再生療法への応用も可能であると考えられる。すなわち、中枢神経系および末梢神経系の虚血性脳神経損傷、外傷性脳神経損傷、脳神経変性疾患、代謝性神経疾患への自家移植療法に応用可能である。

さらに、本発明の分化誘導方法は、中胚葉幹細胞や ES 細胞から神経系細胞への分化の機序を解く糸口を提供している。このような分化を規定する遺伝子が同定・解析されれば、それら遺伝子を利用して中胚葉幹細胞や ES 細胞を効率良く、また十分量、神経系細胞へ形質転換させることが可能となる。従って、神経組織の再生を促すための「遺伝子治療」が

可能となるものと大いに期待される。

21

請求の範囲

1. 脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画に含まれる中胚葉幹細胞、またはES細胞を、基礎的培養液において、33℃～38℃の条件で培養することにより、神経系細胞へ誘導する方法。
2. 単核細胞分画が、脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血を、2000回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07g/mlから1.1g/mlの範囲に含まれる細胞分画を回収することにより調製することができる細胞分画である、請求項1に記載の方法。
3. 中胚葉幹細胞がSH2(+), SH3(+), SH4(+), CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD34(-), CD45(-)の特徴を有する細胞である請求項1または2に記載の方法。
4. 神経系細胞が神経幹細胞、神経前駆細胞、神経細胞、およびグリア細胞からなる群より選択される、請求項1～3に記載の方法。
5. 基礎的培養液にbFGF、EGF、または虚血脳抽出液を加えることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. 請求項1～5のいずれかに記載の方法によって得られる細胞。
7. 請求項6に記載の細胞を含む、神経系疾患の治療ための組成物。
8. 神経系疾患が、中枢性および末梢性の脱髄疾患、中枢性および末梢性の変性疾患、脳卒中、脳腫瘍、高次機能障害、精神疾患、てんかん、外傷性の神経系疾患、および脊髄梗塞からなる群より選択されるものである、請求項7に記載の組成物。
9. 請求項6に記載の細胞、または請求項7に記載の組成物をレシピエントに移植することを特徴とする、神経系疾患の治療方法。

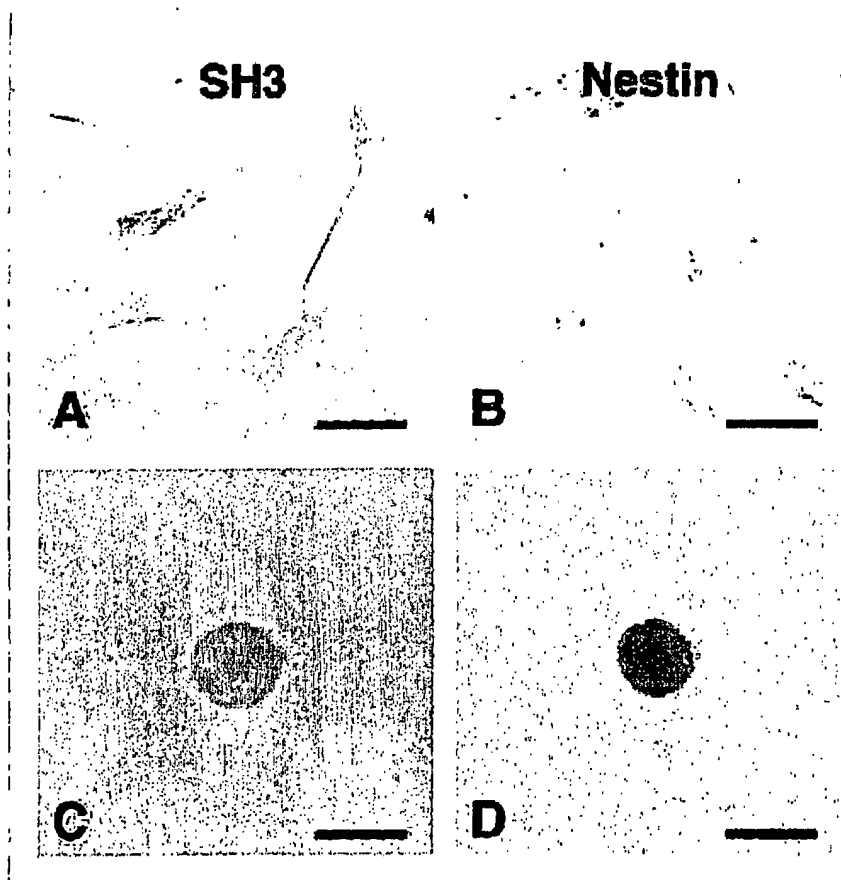
22

10. 神経系疾患が、中枢性および末梢性の脱髄疾患、中枢性および末梢性の変性疾患、脳卒中、脳腫瘍、高次機能障害、精神疾患、てんかん、外傷性の神経系疾患、および脊髄梗塞からなる群より選択されるものである、請求項9に記載の治療方法。

11. 移植する細胞がレシピエントに由来している、請求項9または10に記載の治療方法。

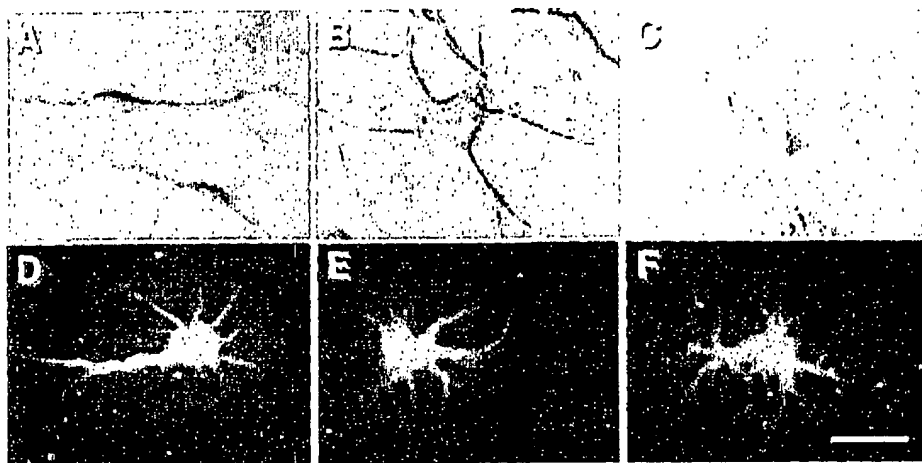
1 / 6

図1



2 / 6

図 2



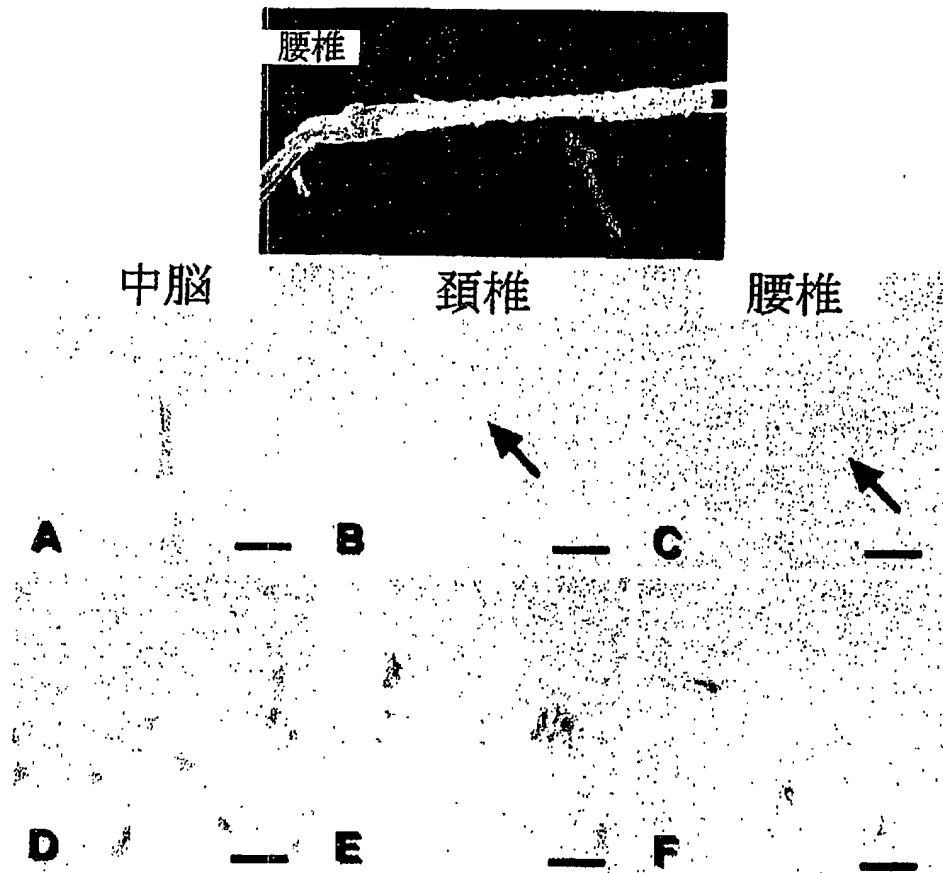
3 / 6

図 3



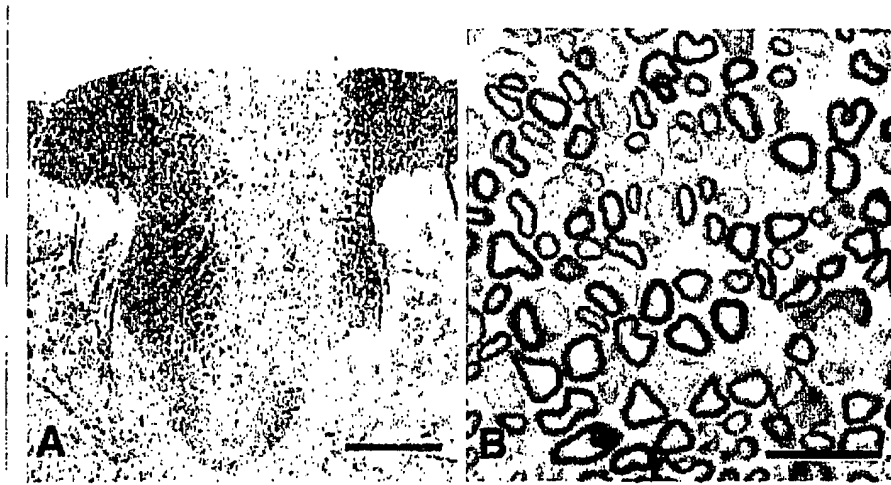
4 / 6

図 4



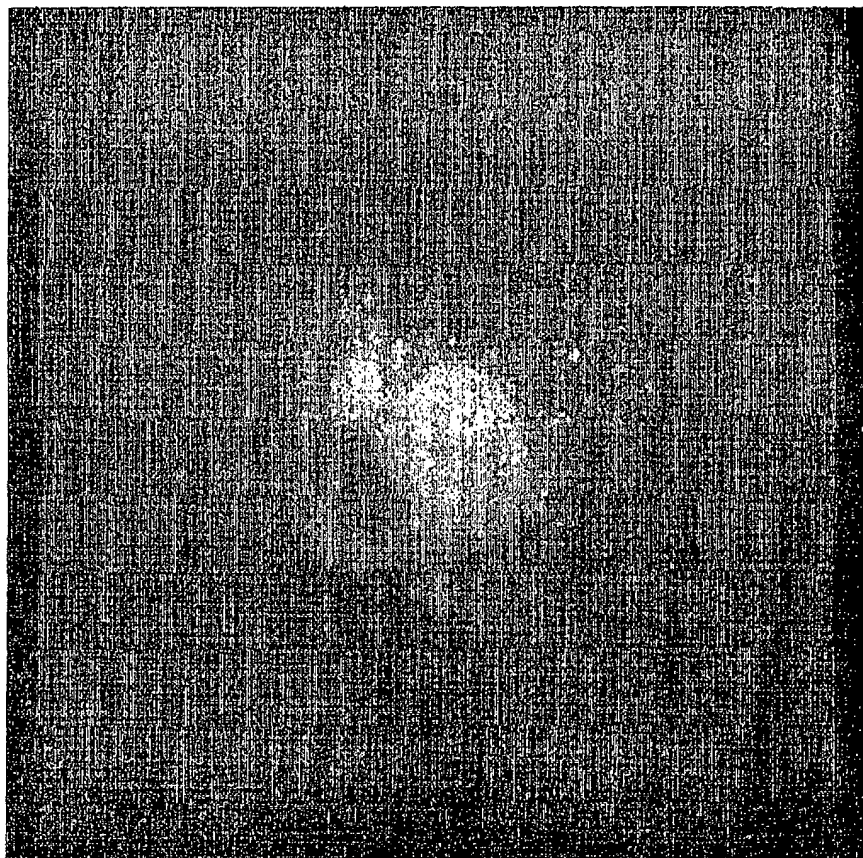
5 / 6

図 5



6 / 6

図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 5/06, A61K 35/28, A61P 25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 5/06, A61K 35/28, A61P 25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SASAKI M. et al. Transplantation of an Acutely Isolated Bone Marrow Fraction Repairs Demyelinated Adult Rat Spinal Cord Axons. GLIA 2001, Vol.35, No.1, pp.26-34	1-8
Y	TREMAIN N. et al. MicroSAGE Analysis of 2,353 Expressed Genes in a Single Cell-Derived Colony of Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals mRNAs of Multiple Cell Lineages. Stem Cells 2001, Vol.19, pp.408-418	1-8
X A	BRÜSTLE O. et al. Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. Science 1999, Vol.285, pp.754-756	1, 4-8 2-3
A	PITTINGER M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 1999, Vol.284, pp.143-147	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 January, 2002 (09.01.02)Date of mailing of the international search report
22 January, 2002 (22.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09510

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9 - 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims involve methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 01/09510

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 5/06, A61K 35/28, A61P 25/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 5/06, A61K 35/28, A61P 25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SASAKI M. et al. Transplantation of an Acutely Isolated Bone Marrow Fraction Repairs Demyelinated Adult Rat Spinal Cord Axons. GLIA 2001, Vol. 35, No. 1, p. 26-34	1-8
Y	TREMAIN N. et al. MicroSAGE Analysis of 2,353 Expressed Genes in a Single Cell-Derived Colony of Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals mRNAs of Multiple Cell Lineages. Stem Cells 2001, Vol. 19, p. 408-418	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.01.02

国際調査報告の発送日

22.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4 N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	BRÜSTLE O. et al. Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. Science 1999, Vol. 285, p. 754-756	<u>1, 4-8</u> 2-3
A	PITTENGER M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 1999, Vol. 284, p. 143-147	1-8

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 - 11 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
ヒトの治療方法を含むものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.